

# DIAMINOFLUORESCEIN DERIVATIVE

**Patent number:** JP10226688  
**Publication date:** 1998-08-25  
**Inventor:** NAGANO TETSUO; KOJIMA HIROTAKE  
**Applicant:** NAGANO TETSUO  
**Classification:**  
- international: C07D493/10; G01N21/64; G01N21/78; G01N31/00  
- european: C07D493/10  
**Application number:** JP19970034547 19970219  
**Priority number(s):** JP19970034547 19970219

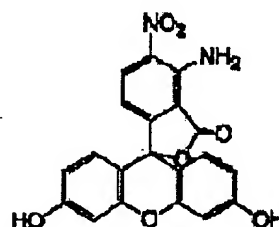
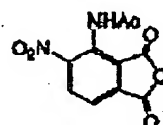
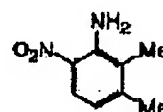
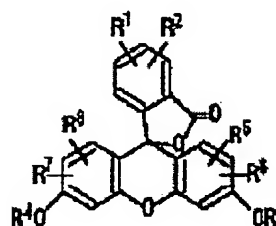
Also published as:

US5874590 (A1)

Report a data error here

## Abstract of JP10226688

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a new diamino fluorescein derivative capable of efficiently reacting with nitrogen monoxide under a neutral condition, giving a fluorescent substance excellent in fluorescent strength and useful as a reagent for measuring the nitrogen monoxide, etc. **SOLUTION:** A new diamino fluorescein derivative represented by formula I (R<1>, R<2> are each an amino group substituted at adjacent positions on the phenyl ring; R<3>, R<4> are each H, an acyl; R<5> to R<8> are each H, a 1-6C alkyl, an aryl, a halogen). The compound of formula I can efficiently react with nitrogen monoxide under a neutral condition, can give a fluorescent substance excellent in fluorescent strength, and is useful as a reagent for measuring the nitrogen monoxide, etc. The compound of formula I is obtained by protecting the amino group of 2,3-dimethyl-5-nitroaniline of formula II (Me is methyl), oxidizing the methyl group, deriving an acid anhydride from the produced dicarboxylic acid, subjecting the derivative to a ring-closing condensation reaction with a resorcinol compound, and subsequently reducing the nitro group of the produced aminonitrofluorescein compound of formula IV.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-226688

(43) 公開日 平成10年(1998) 8月25日

(51) Int.Cl.<sup>5</sup> 識別記号

C 0 7 D 493/10

G 0 1 N 21/64

21/78

31/00

F I

C 0 7 D 493/10

G 0 1 N 21/64

21/78

31/00

E

Z

C

H

審査請求 有 請求項の数 5 O L (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願平9-34547

(22) 出願日 平成9年(1997) 2月19日

特許法第30条第1項適用申請有り 1996年10月23日 社団法人日本薬学会発行の「第16回メディシナルケミストリーシンポジウム 第5回医薬化学部会年会講演要旨集」に発表

(71) 出願人 595108044

長野 哲雄

東京都杉並区天沼1-28-15

(72) 発明者 長野 哲雄

東京都杉並区阿佐谷北3丁目32番地25号  
110

(72) 発明者 小島 宏建

東京都豊島区目白2丁目19番地4号 足達方

(74) 代理人 弁理士 今村 正純 (外1名)

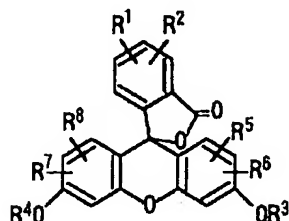
(54) 【発明の名称】 ジアミノフルオレセイン誘導体

(57) 【要約】

【課題】 中性条件下において一酸化窒素と効率よく反応でき、蛍光強度に優れた蛍光性物質を与える化合物を提供する。

【解決手段】 下記の一般式：

【化1】



(式中、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>はそれぞれフェニル環上の隣接した位置に置換するアミノ基を示し；R<sup>3</sup>及びR<sup>4</sup>はそれぞれ独立に水素原子又はアシル基を示し；R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、及びR<sup>8</sup>はそれぞれ独立に水素原子、C<sub>1-6</sub>アルキル基、アリル基、又はハロゲン原子、好ましくはそれぞれ独立に水素原子又は塩素原子を示す)で表される化合物、及び該化合物を含む一酸化窒素測定用試薬。

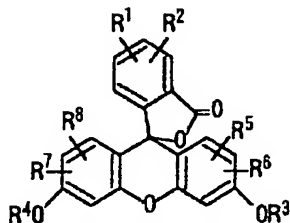
(2)

特開平10-226688

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の一般式：

【化1】



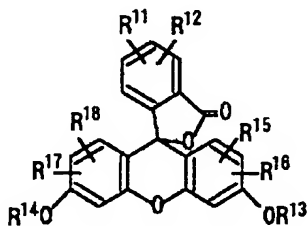
（式中、 $R^1$  及び  $R^2$  はそれぞれフェニル環上の隣接した位置に置換するアミノ基を示し； $R^3$  及び  $R^4$  はそれぞれ独立に水素原子又はアシル基を示し； $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、及び  $R^8$  はそれぞれ独立に水素原子、 $C_{1-6}$  アルキル基、アリル基、又はハロゲン原子を示す）で表される化合物。

【請求項2】  $R^3$  及び  $R^4$  がそれぞれ独立に水素原子又は  $C_{1-6}$  アルキルカルボニル基であり、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、及び  $R^8$  がそれぞれ独立に水素原子又は塩素原子である請求項1に記載の化合物。

【請求項3】 請求項1又は2に記載の化合物を含む一酸化窒素測定用試薬。

【請求項4】 下記の一般式：

【化2】



【式中、 $R^{11}$  及び  $R^{12}$  は互いに結合してフェニル環上の隣接した位置に環を形成する  $-N=N-NR^{19}-$ （式中、 $R^{19}$  は水素原子、 $C_{1-18}$  アルキル基、又は置換若しくは無置換アラルキル基を示す）で表される基を示すか、又は  $R^{11}$  及び  $R^{12}$  はフェニル環上の隣接した位置に置換するアミノ基及びニトロ基の組み合わせを示し； $R^{13}$  及び  $R^{14}$  はそれぞれ独立に水素原子又はアシル基を示し； $R^{15}$ 、 $R^{16}$ 、 $R^{17}$ 、及び  $R^{18}$  はそれぞれ独立に水素原子、 $C_{1-6}$  アルキル基、アリル基、又はハロゲン原子を示す）で表される化合物。

【請求項5】 一酸化窒素の測定方法であって、(1) 請求項1又は2に記載の化合物を一酸化窒素と反応させる工程；及び(2) 上記工程(1)において生成する請求項4に記載の化合物を検出する工程を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、一酸化窒素の測定用試薬として有用なフルオレセイン誘導体、並びに該化合物を含む一酸化窒素測定用試薬に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 一酸化窒素( $NO$ )は短寿命の不安定ラジカル種であり、生体内生理活性物質として重要な機能を有していることが明らかにされてきた(現代化学, 1994年4月号特集)。一酸化窒素の測定方法は、一酸化窒素の酸化分解物である  $NO_2^-$  や  $NO_3^-$  を測定する間接的な方法と、一酸化窒素を直接測定する方法に大別される。一酸化窒素を生理的条件下で検出・定量するという観点からは直接法が注目されているものの、現時点ではイン・ビトロ系に適用できる特異的かつ高感度な検出方法は開発されていない。

【0003】 例えば、 $NO$  ラジカルをオゾン酸化したときに発生する発酵を利用する化学発光法(Palmer, R.M., et al., Nature, 327, pp.524-526, 1987)、オキシヘモグロビン( $O_2Hb$ )が酸化されて生じるmethHbの吸収スペクトルを測定する方法(Kelm, M., et al., Circ. Res. 66, pp.1561-1575, 1990)、電極を組織に差し込んで酸化されるときに流れる電流で定量する方法(Shibuki, K., Neurosci. Res. 9, pp.69-76, 1990; Malinski, T., Nature, 356, pp.676-678, 1992)、及びグリース反応法(Green, L.C., et al., Anal. Biochem., 126, pp.131-138, 1992)などが代表的な方法として知られている(総説として、戸田 昇編集「最新医学からのアプローチ12,  $NO$ 」, pp.42-52, 3.  $NO$ の測定法, 長野哲雄著, メジカルビュー社発行; Archer, S., FASEB J., 7, pp.349-360, 1993)。

【0004】 グリース反応法は、一酸化窒素ラジカルが酸化されて生じる  $NO_2^-$  によるジアゾニウム塩化合物とナフチルエチレンジアミンのアゾカップリングを利用して検出する方法である。この方法は、一酸化窒素ラジカルを直接測定するものではないが、特別な装置や技術を必要としないという利点を有している。またカドミウム(Stainton, M.P., Anal. Chem., 46, p.1616, 1974; Green, L.C., et al., Anal. Biochem., 126, pp.131-138, 1982)やヒドラジン(Sawicki, C.R. and Scaringelli, F.P., Microchem. J., 16, pp.657-672, 1971)で  $NO_3^-$  を  $NO_2^-$  に還元して測定できることから、一酸化窒素関連代謝物を定量できるという特徴もある。

【0005】 グリース反応法と同様に  $NO_2^-$  を検出することにより一酸化窒素を測定するための試薬として2,3-ジアミノナフタレン(2,3-diaminonaphthalene)が知られている。この試薬は、酸性条件下で  $NO_2^-$  と反応して蛍光性付加体であるナフタレントリアゾール(化学名: 1-[H]-naphtho[2,3-d]triazole)を形成する(Wiersma, J. H., Anal. Lett., 3, pp.123-132, 1970)。2,3-ジアミノナフタレンと  $NO_2^-$  の反応条件については詳細に検討されており、反応は  $pH=2$  以下で最も速く進行し、室温下では約5分程度で完了する(Wiersma, J.H., Anal. Lett., 3, pp.123-132, 1970; Sawicki, C.R., Anal. Lett., 4, pp.761-775, 1971)。また、生成した付加体は  $pH=10$  以上で最も効率よく蛍光を発する(Damiani, P. and

(3)

特開平10-226688

Burini, G., Talanta, 8, pp.649-652, 1986).

【0006】この2,3-ジアミノナフタレンを用いる一酸化窒素の測定方法は、検出限界が数十nM程度であり、グリース反応法に比べて50~100倍も高感度であるという特徴がある(Misko, T.P., Anal. Biochem. 214, pp.11-16, 1993)。また、この方法は特別な装置や技術を必要とせず、簡便に行えるという点でも非常に優れた方法である(以上について、総説として DOJIN News, No. 74, Information・NOの測定試薬: 2,3-Diaminonaphthalene, 株式会社同仁化学研究所発行、1995)。しかしながら、一酸化窒素自体ではなくその酸化物である  $\text{NO}_2^-$  を反応種としているので、一酸化窒素を直接測定する方法に比べて間接的な方法であり、また、2,3-ジアミノナフタレンと  $\text{NO}_2^-$  の反応を強酸性下(pH=2以下)で行うところから、一酸化窒素を生理的条件下で検出・定量する方法としては採用できないという問題があった。

【0007】本発明者は、生理的条件下で一酸化窒素を直接的かつ高感度に測定する手段を提供すべく研究を進めた結果、溶存酸素やオキシド化合物(例えばPTIOやその誘導体であるカルボキシPTIOなど)の酸素源の存在下では、2,3-ジアミノナフタレン又はその誘導体に対して中性条件下においても一酸化窒素が効率よく反応し、蛍光性のナフタレントリアゾール又はその誘導体を与えることを見出した。また、この反応を応用した一酸化窒素の測定方法が極めて検出感度に優れており、微量の一酸化窒素を正確に定量できることを見出した(特願平7-189978号明細書参照)。

【0008】しかしながら、2,3-ジアミノナフタレンを用いる上記の方法では、蛍光の検出において370~390nm程度の低波長の励起光を照射する必要があるので、測定系内の細胞や組織がダメージを受ける可能性があった。また、細胞自身の強い自家蛍光が測定に影響を与えることがあり、通常の蛍光顕微鏡に備えられている蛍光フィルターでは蛍光測定時に励起光を十分にカットできないという問題もあった。さらに、2,3-ジアミノナフタレンから生成する蛍光性のトリアゾール化合物は蛍光強度が必ずしも十分ではないので、汎用の蛍光顕微鏡では個々の細胞内の蛍光を正確に測定することが困難であった。一方、2,3-ジアミノナフタレン自体は単純な化学構造を有しており、例えば、試薬が細胞内部に局在化するように種々の化学的修飾を加える基本骨格としては好適ではないという問題もあった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、一酸化窒素の測定に有用な化合物を提供することにある。より具体的には、中性条件下において一酸化窒素と効率よく反応でき、蛍光強度に優れた蛍光性物質を与える化合物を提供することが本発明の課題である。また、本発明の別の課題は、上記の特徴を有する化合物であって、生体組織や細胞に対してダメージを与えないような長波長の

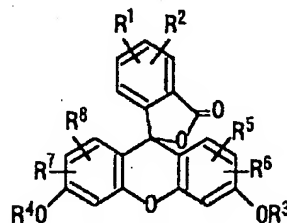
励起光により一酸化窒素を測定可能な化合物を提供することにある。さらに本発明の別の課題は、上記の特徴を有する化合物を含む一酸化窒素測定用試薬を提供することであり、より具体的には、細胞の内部に存在する一酸化窒素を個々の細胞ごとに正確に測定することができる一酸化窒素測定用試薬を提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者は上記の課題を解決すべく鋭意努力した結果、それ自体はほとんど蛍光性を有しない特定のフルオレセイン誘導体が、中性条件下で一酸化窒素と容易に反応して高い蛍光強度を有するトリアゾール化合物を与えることを見いだした。また、該トリアゾール誘導体が495nm程度の長波長の励起光により515nm程度の強い蛍光を発するので、汎用の蛍光顕微鏡に備えられた蛍光フィルターで励起光を容易に分光することができること、並びに、個々の細胞内の蛍光を測定することにより、簡便に細胞内の一酸化窒素濃度を測定できることを見いだした。本発明はこれらの知見を基にして完成されたものである。

【0011】すなわち本発明は、下記の式(I):

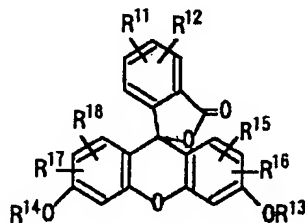
【化3】



(式中、 $\text{R}^1$ 及び $\text{R}^2$ はそれぞれフェニル環上の隣接した位置に置換するアミノ基を示し; $\text{R}^3$ 及び $\text{R}^4$ はそれぞれ独立に水素原子又はアシル基を示し; $\text{R}^5$ 、 $\text{R}^6$ 、 $\text{R}^7$ 、及び $\text{R}^8$ はそれぞれ独立に水素原子、 $\text{C}_{1-6}$ アルキル基、アリル基、又はハロゲン原子を示す)で表される化合物を提供するものである。この発明の好ましい態様によれば、 $\text{R}^3$ 及び $\text{R}^4$ がそれぞれ独立に水素原子又は $\text{C}_{1-6}$ アルキルカルボニル基であり; $\text{R}^5$ 、 $\text{R}^6$ 、 $\text{R}^7$ 、及び $\text{R}^8$ がそれぞれ独立に水素原子又は塩素原子である化合物が提供される。本発明の別の態様によれば、上記化合物を含む一酸化窒素測定用試薬が提供される。

【0012】また、本発明のさらに別の態様によれば、下記の式(II):

【化4】



(式中、 $\text{R}^{11}$ 及び $\text{R}^{12}$ は互いに結合してフェニル環上の

(4)

特開平10-226688

隣接した位置に環を形成する $-N=N-NR^{19}-$  (式中、 $R^{19}$  は水素原子、 $C_{1-18}$  アルキル基、又は置換若しくは無置換アリール基を示す) で表される基を示すか、又は $R^{11}$  及び $R^{12}$  はフェニル環上の隣接した位置に置換するアミノ基及びニトロ基の組み合わせを示し; $R^{13}$  及び $R^{14}$  はそれぞれ独立に水素原子又はアシル基を示し; $R^{15}$ 、 $R^{16}$ 、 $R^{17}$ 、及び $R^{18}$  はそれぞれ独立に水素原子、 $C_{1-6}$  アルキル基、アリール基、又はハロゲン原子を示す] で表される化合物が提供される。この発明の好ましい態様によれば、 $R^{13}$  及び $R^{14}$  がそれぞれ独立に水素原子又は $C_{1-6}$  アルキルカルボニル基であり; $R^{15}$ 、 $R^{16}$ 、 $R^{17}$ 、及び $R^{18}$  がそれぞれ独立に水素原子又は塩素原子である化合物が提供される。

【0013】さらに本発明の別の態様により、一酸化窒素の測定方法であって、(1) 上記式(I) で示される化合物を一酸化窒素と反応させる工程; 及び、(2) 上記工程(1)において生成する式(II)の化合物を検出する工程を含む方法が提供される。

【0014】

【発明の実施の形態】上記一般式(I) において、 $R^1$  及び $R^2$ はそれぞれフェニル環上の隣接した位置に置換するアミノ基を示す。 $R^1$  及び $R^2$ が共に無置換のアミノ基であることが好ましいが、 $R^1$  及び $R^2$ のうちのいずれかがモノ置換アミノ基であってもよい。アミノ基上に置換する置換基としては、例えば、直鎖又は分枝鎖の $C_{1-18}$  アルキル基 (好ましくは $C_{1-6}$  アルキル基)、又は置換若しくは無置換のアリール基が置換した $C_{1-6}$  アルキル基 (アリール基) などを挙げることができる。本明細書において特に言及しない場合には、 $C_{1-6}$  アルキル基は直鎖又は分枝鎖のいずれでもよく、具体的には、例えば、メチル基、エチル基、 $n$ -プロピル基、イソプロピル基、 $n$ -ブチル基、 $sec$ -ブチル基、 $tert$ -ブチル基などを用いることができる。アリール置換アルキル基としては、例えば、ベンジル基、フェネチル基、パラメトキシベンジル基、パラエトキシカルボニルベンジル基、パラカルボキシベンジル基などを用いることができる。

【0015】 $R^3$  及び $R^4$  はそれぞれ独立に水素原子又はアシル基を示す。アシル基としては、例えば、ベンゾイル基、パラメトキシベンゾイル基、パラクロロベンゾイル基、若しくはナフチルカルボニル基などのアリールカルボニル基; 又はアセチル基、プロピオニル基、ブタノイル基などの $C_{1-8}$  アルキルカルボニル基などを用いることができる。 $R^3$  及び $R^4$  が独立に水素原子又はアセチル基であることが好ましく、 $R^3$  及び $R^4$  が共に水素原子であるか、又は共にアセチル基である場合が特に好ましい。

【0016】 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、及び $R^8$  はそれぞれ独立に水素原子、 $C_{1-6}$  アルキル基、アリール基( $CH_2=CH-CH_2-$ )、又はハロゲン原子を示す。ハロゲン原子としては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子のいずれでもよいが、塩素原子であることが好ましい。 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、

及び $R^8$  がそれぞれ独立に水素原子又は塩素原子であることが好ましく、 $R^5$  及び $R^6$  が共に水素原子であるか、又は共に塩素原子であり、 $R^7$  及び $R^8$  が共に水素原子であることが好ましい。それぞれのフェニル環上における $R^5$  及び $R^6$ 、並びに $R^7$  及び $R^8$ の置換位置は特に限定されないが、キサンテン骨格の2-位、4-位、5-位、及び7-位から選ばれる位置に置換していることが好ましい。

【0017】上記の式(II)において、 $R^{11}$  及び $R^{12}$  は互いに結合してフェニル環上の隣接した位置に環を形成する $-N=N-NR^{19}-$ 基を示す。ここで、 $R^{19}$  は水素原子、直鎖又は分枝鎖の $C_{1-18}$  アルキル基 (好ましくは $C_{1-6}$  アルキル基)、又は置換若しくは無置換のアリール基が置換した $C_{1-6}$  アルキル基を示す。アリール置換アルキル基としては、例えば、ベンジル基、フェネチル基、パラメトキシベンジル基、パラエトキシカルボニルベンジル基、パラカルボキシベンジル基などを用いることができる。また、 $R^{11}$  及び $R^{12}$  はフェニル環上の隣接した位置に置換するアミノ基及びニトロ基の組み合わせを示し、 $R^{11}$  又は $R^{12}$  のいずれか一方はアミノ基を示し、他方はニトロ基を示す。 $R^{11}$  又は $R^{12}$  が示すアミノ基は無置換であってもよいが、例えば、 $C_{1-18}$  アルキル基 (好ましくは $C_{1-6}$  アルキル基) や上記に説明した置換若しくは無置換アリール基が置換した $C_{1-6}$  アルキル基などの置換基を1個有していてもよい。また、アセチル基、トリフルオロアセチル基、ベンゾイル基などのアシル基; トリメチルシリル基などのアルキルシリル基などの保護基を有していてもよい。ベンジル基などのアリールアルキル基を保護基として利用してもよい。

【0018】 $R^{13}$  及び $R^{14}$  はそれぞれ独立に水素原子又はアシル基を示す。アシル基としては、例えば、ベンゾイル基、パラメトキシベンゾイル基、パラクロロベンゾイル基、若しくはナフチルカルボニル基などのアリールカルボニル基; 又はアセチル基、プロピオニル基、ブタノイル基などの $C_{1-8}$  アルキルカルボニル基などを用いることができる。 $R^{13}$  及び $R^{14}$  が独立に水素原子又はアセチル基であることが好ましく、 $R^{13}$  及び $R^{14}$  が共に水素原子であるか、又は共にアセチル基である場合が特に好ましい。

【0019】 $R^{15}$ 、 $R^{16}$ 、 $R^{17}$ 、及び $R^{18}$  はそれぞれ独立に水素原子、 $C_{1-6}$  アルキル基、アリール基、又はハロゲン原子を示す。ハロゲン原子としては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子のいずれでもよいが、塩素原子であることが好ましい。 $R^{15}$ 、 $R^{16}$ 、 $R^{17}$ 、及び $R^{18}$  がそれぞれ独立に水素原子又は塩素原子であることが好ましく、 $R^{15}$  及び $R^{16}$  が共に水素原子であるか、又は共に塩素原子であり、 $R^{17}$  及び $R^{18}$  が共に水素原子であることが好ましい。それぞれのフェニル環上における $R^{15}$  及び $R^{16}$ 、並びに $R^{17}$  及び $R^{18}$ の置換位置は特に限定されないが、キサンテン骨格の2-位、4-位、5-位、及び7-位から選ばれる位置に置換しているこ

(5)

特開平10-226688

とが好ましい。

【0020】上記の式(I)の化合物及び式(II)の化合物(ただし、 $R^{11}$ 及び $R^{12}$ がフェニル環上の隣接した位置に置換するアミノ基及びニトロ基の組み合わせを示す化合物)は、例えば、以下のスキームに従って製造することができ、その詳細は本明細書の実施例に具体的に説明されている。従って、上記の式(II)の化合物が式(I)の化合物の製造中間体として有用であることが理解されよ

う。また、式(II)で示される化合物のうち、 $R^{11}$ 及び $R^{12}$ が互いに結合してフェニル環上の隣接した位置に環を形成する $-N=N-NR^{19}-$ 基を示す化合物については、上記式(I)の化合物と一酸化窒素とを反応させることにより製造可能である。この化合物は、後述のように強い蛍光性を有しており、一酸化窒素の測定に有用である。

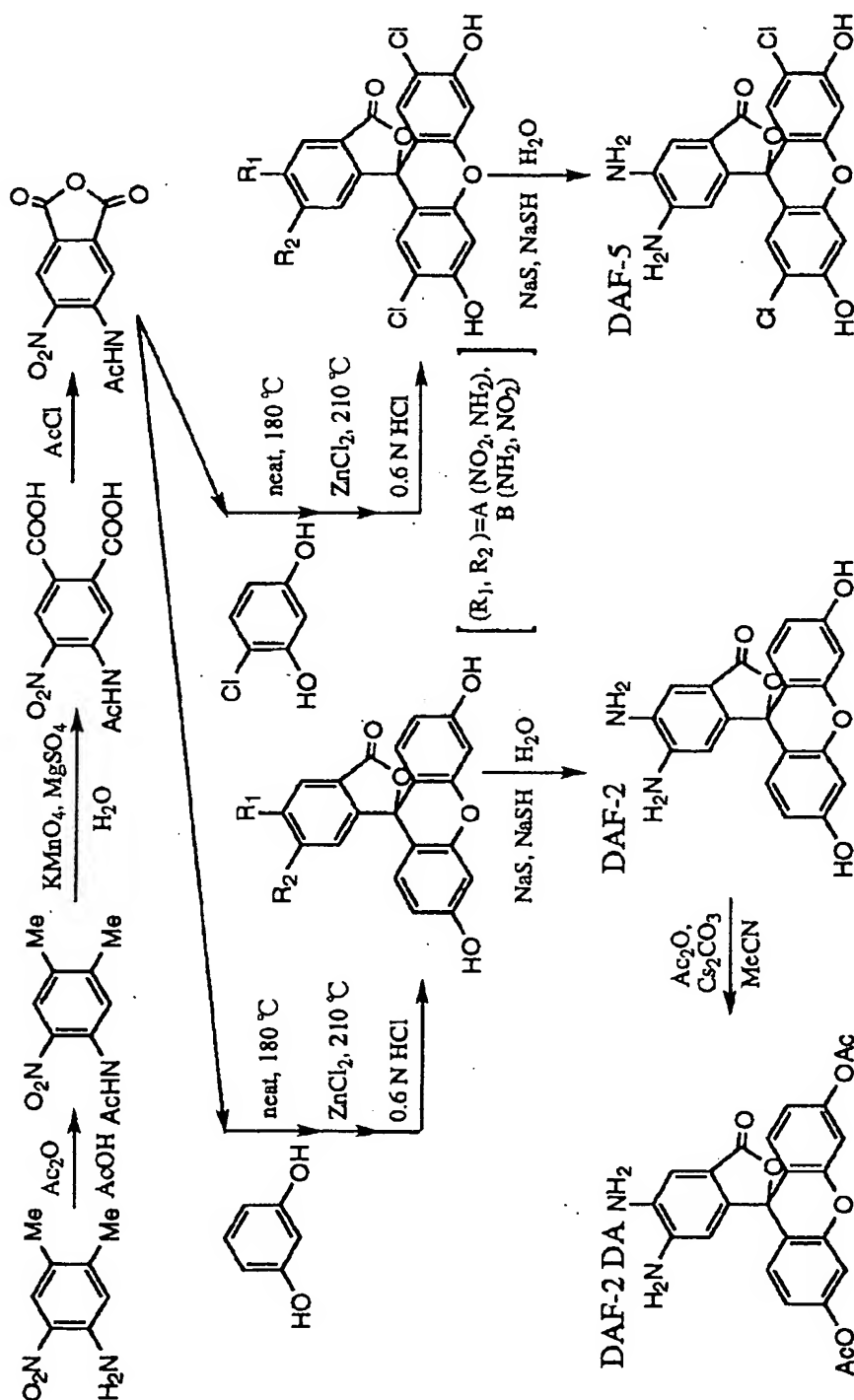
【0021】

【化5】

特開平10-226688



特開平10-226688



の式(I)及び式(II)で表される化合物は1個または2個以上の不斉炭素有している場合がある。従って、1個または2個以上の不斉炭素に基づく光学的に純粋な形態の任意の光学異性体、光学異性体の任意の混合物、ラセミ体、純粋な形態のジアステレオ異性体、ジアステレオ異性体の混合物などはいずれも本発明の範囲に含まれる。また、本発明の式(I)及び式(II)で表される化合物はナトリウム塩、カリウム塩などの塩基付加塩、又は塩



(8)

特開平10-226688

酸塩、硫酸塩、パラトルエンスルホン酸塩などの酸付加塩として存在する場合があるが、これらの任意の塩も本発明の範囲に含まれる。遊離形態の化合物又は塩の形態の化合物は水和物や溶媒和物として存在する場合もあるが、これらの物質も本発明の範囲に含まれることはない。

【0024】さらに、フルオレセイン誘導体は、ラクトン環を形成していない形態の化合物[9-(*o*-カルボキシフェニル)-6-ヒドロキシ-3H-キサンテン-3-オン]としても存在することが知られているが、本発明の化合物についてもこのような構造異性体が存在しており、それらが本発明の範囲に含まれることも当業者に容易に理解されよう。なお、上記式(I)及び式(II)、並びに上記スキームにおいては、便宜上、ラクトン環を形成した化合物についてのみ記載してある。

【0025】本発明の式(I)で表される化合物は、中性条件下において一酸化窒素と効率的に反応して収率よく式(II)の化合物(ただし、 $R^{11}$ 及び $R^{12}$ が互いに結合してフェニル環上の隣接した位置に環を形成する-N=N-NR<sup>19</sup>-基を示す化合物)を生成する性質を有している。式(I)で表される化合物自体は、中性条件下において495nm程度の励起光を照射した場合にはほとんど蛍光を発しないが、上記式(II)の化合物は同じ条件下において極めて強い蛍光(emission: 515 nm)を発する性質を有している。従って、式(I)で表される化合物を生体組織中や細胞内に取り込ませて一酸化窒素と反応させ、蛍光性の上記式(II)の化合物を生成させてこの化合物の蛍光を測定することにより、生体組織中や細胞内の一酸化窒素を測定することができる。

【0026】従って、本発明により提供される一酸化窒素の測定方法は、式(I)で表される化合物と一酸化窒素とを反応させて式(II)の化合物を生成させ、式(II)の化合物の蛍光を測定する工程を含んでいる。本明細書において「測定」という用語は、検出、定量、定性など種々の目的の測定を含めて最も広義に解釈されるべきである。上記反応は好ましくは中性条件下に行うことができ、例えば、pH 6.0~8.0の範囲、好ましくはpH 6.5~7.8の範囲、より好ましくはpH 6.8~7.6の範囲で行うことができるが、本発明の一酸化窒素の測定は中性領域に限定されることはない。例えば、胃の粘膜細胞など強酸性の条件においても測定が可能である。

【0027】なお、式(I)の化合物のうち $R^5$ 及び $R^6$ が塩素原子である化合物は、pHが5~8程度の間で感度を維持できるという優れた性質を有しているため、広範囲なpH領域での測定が必要な場合には、上記の化合物を試薬として用いることが好ましい。さらに、例えば $R^3$ 及び $R^4$ がアセチル基の化合物は、細胞膜を容易に通過して細胞内部に取り込まれた後、アセトキシ基のエステルが加水分解されて $R^3$ 及び $R^4$ が水素原子の化合物を与えるが、生成したジヒドロキシ化合物は親水性が高いため細胞内部

から細胞外に容易に排出されることがない。従って、 $R^3$ 及び $R^4$ がアセチル基の化合物は、それ自体が測定試薬として有用であるほか、細胞内部に高濃度の測定試薬( $R^3$ 及び $R^4$ が水素原子の化合物)を輸送するためのプロドラッグとしても有用である。

【0028】蛍光の測定は、従来公知の蛍光測定方法に準じて行うことができる(例えば、Wiersma, J.H., *Anal. Lett.*, 3, pp.123-132, 1970; Sawicki, C.R., *Anal. Lett.*, 4, pp.761-775, 1971; Damiani, P. and Burini, G., *Talanta*, 8, pp.649-652, 1986; Damiani, P. and Burini, G., *Talanta*, 8, pp.649-652, 1986; Misako, T.P., *Anal. Biochem.* 214, pp.11-16, 1993などの刊行物を参照)。本発明の一酸化窒素測定においては、例えば、励起光として495 nm程度の光を照射し、515 nm程度の蛍光を測定することが好ましい。このような波長の光を用いると、汎用の蛍光顕微鏡に備えられた蛍光フィルターでも効率的に分光することができ、特殊なフィルターを用いずに高感度な測定が可能になる。

【0029】また、特に高感度な測定が必要な場合には、上記の一酸化窒素の測定を酸素源の存在下に行ってもよい。酸素源としては、例えば、酸素、オゾン、又はオキシド化合物などを用いることが可能である。酸素としては、一般的には溶存酸素を用いることができるが、必要に応じて、反応系内に酸素ガスを導入するか、酸素発生用試薬(例えば、過酸化水素など)を添加してもよい。オキシド化合物としてはN-O、S-O、P-Oなど容易に酸素原子が開裂されるオキシド結合を有する化合物であれば特に限定されないが、例えば、PTIO(2-フェニル-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン-1-オキシド-3-オキシド: Maeda, H., et al., *J. Leuk. Biol.*, 56, p.588-592, 1994; Akaike, T., et al., *Biochemistry*, 32, pp.827-832, 1993)またはその誘導体(PTIOのフェニル基の*p*-位にカルボキシル基が導入されたカルボキシPTIOなど)、トリフェニルホスフィンオキサイド、トリエチルアミンオキサイドなどを用いることができる。

【0030】上記のオキシド化合物のうち、PTIO及びその誘導体(例えばカルボキシPTIOなど)は特に好ましい化合物であり、当業者に容易に入手可能な化合物である(東京化成株式会社、Organic Chemicals Catalog, 32, 1994などに記載されている)。なお、オキシド化合物はそれ自体を反応試薬として用いてもよいが、リボソーム等に封入したものをを用いることもできる。酸素源の量は特に限定されないが、少なくとも測定すべき一酸化窒素に対して1 $\mu$ モル以上、好ましくは10~30 $\mu$ モル、より好ましくは10~20 $\mu$ モル程度の量であることが好ましい。生体試料などの測定では、試料中に10~20 $\mu$ モル程度の量を添加することが好ましいが、一般的には、溶存酸素により必要量の酸素源が供給される。酸素源の量が極端に少ないと測定感度が低下する場合があり、酸素源の量が極端に多いと蛍光による発光に不都合を生じる

(9)

特開平10-226688

場合がある。従って、測定すべき酸化窒素の量を予試験若しくは公知の方法で予測して適宜の濃度範囲の酸素源を添加することが好ましい。反応は10~25℃の温度範囲で行うことが可能である。

## 【0031】

【実施例】以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。実施例中、“DAF-1”などの化合物名は上記のスキーム中に記載された化合物名に対応させてある。

## 例1

2,3-ジメチル-6-ニトロアニリンを酢酸に溶解し、無水酢酸1当量でアセチル化して3-アセトアミド-4-ニトロキシレンを得た。生成物をエタノールから再結晶した後、硫酸マグネシウムを含む熱水に溶解した。この溶液に6当量の過マンガン酸カリウムを水に懸濁して数回に分けて注ぎ、紫色がなくなるまで加熱還流した。反応液を熱時濾過し、冷後に濾液を塩酸で酸性にして酢酸エチルで抽出。生成した3-アセトアミド-4-ニトロフタル酸を無水酢酸中で塩化アセチルを用いて酸無水物に変換した。溶媒を減圧留去した後、残渣に無水塩化メチレンを少量加えて、析出する固体を濾取して3-アセトアミド-4-ニトロ無水フタル酸を得た。同様に、4,5-ジメチル-2-ニトロアニリンから、4-アセトアミド-5-ニトロ無水フタル酸を製造した。

## 【0032】例2：DAF-1の製造

3-アセトアミド-4-ニトロ無水フタル酸とレゾルシノールを180℃で溶融し、2時間後、塩化亜鉛を加えて乾固するまで210℃に保った。冷後、得られた固体を0.6N塩酸中で1時間還流し、反応混合物を冷却して黒色の固体を濾取した。生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製してアミノニトロフルオレセインを得た。得られたアミノニトロフルオレセインを水中で硫化ナトリウムと水硫化ナトリウムを用いて還元し、生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して表題の化合物を得た。

【0033】3-アミノ-4-ニトロフルオレセイン (3-amino-4-nitro-3',6'-dihydroxy-Spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-(9H)xanthen]-3-one)

$C_{20}H_{12}N_2O_7$ , F.W. 392.316

$^1H$ -NMR (300MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  6.38 (d, 1H, J = 8.6); 6.56 (dd, 2H, J = 8.6, 2.4); 6.66 (d, 2H, J = 2.4); 6.80 (d, 2H, J = 8.6); 7.96 (s, 2H); 8.35 (d, 1H, J = 8.6); 10.18 (s, 2H)

3,4-ジアミノフルオレセイン (DAF-1: 4,5-diamino-3',6'-dihydroxy-Spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-(9H)xanthen]-3-one)

$C_{20}H_{14}N_2O_5$ , F.W. 362.322,

m.p. 300℃以上,

MS (EI) (m/z) M + 362

$^1H$ -NMR (300MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  5.01 (s, 2H); 5.88 (s, 2

H); 6.05 (d, 1H, J = 7.5); 6.52 (dd, 2H, J = 8.6, 2.4); 6.60 (d, 2H, J = 2.4); 6.64 (d, 2H, J = 8.6); 6.78 (d, 1H, J = 7.5); 9.97 (s, 2H)

## 【0034】例3：DAF-3の製造

例2と同様にして DAF-3を製造した。

6-アミノ-5-ニトロフルオレセイン (6-amino-5-nitro-3',6'-dihydroxy-Spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-(9H)xanthen]-3-one)

$C_{20}H_{12}N_2O_7$ , F.W. 392.316

$^1H$ -NMR (300MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  6.40 (s, 2H); 6.56 (dd, 2H, J = 8.6, 2.4); 6.71 (d, 2H, J = 2.4); 6.72 (d, 2H, J = 8.6); 7.22 (d, 1H, J = 8.6); 8.38 (d, 1H, J = 8.6); 10.18 (s, 2H)

5,6-ジアミノフルオレセイン (DAF-3: 6,7-diamino-3',6'-dihydroxy-Spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-(9H)xanthen]-3-one)

$C_{20}H_{14}N_2O_5$ , F.W. 362.322,

m.p. 220-230℃,

MS (EI) (m/z) M + 362

$^1H$ -NMR (300MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  3.80 (s, 2H); 5.58 (s, 2H); 6.53 (dd, 2H, J = 8.6, 2.4); 6.62 (d, 2H, J = 8.6); 6.65 (d, 2H, J = 2.4); 6.79 (d, 1H, J = 7.9); 7.07 (d, 1H, J = 7.9); 10.01 (s, 2H)

## 【0035】例4：DAF-2の製造

4-アセトアミド-5-ニトロ無水フタル酸とレゾルシノールを用いて、例2と同様にしてDAF-2を製造した。

5-アミノ-4-ニトロフルオレセイン (5-amino-4-nitro-3',6'-dihydroxy-Spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-(9H)xanthen]-3-one)

$C_{20}H_{12}N_2O_7$ , F.W. 392.316

$^1H$ -NMR (300MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  6.58 (dd, 2H, J = 8.6, 2.2); 6.63 (s, 1H); 6.65 (d, 2H, J = 2.2); 6.75 (d, 2H, J = 8.6); 7.92 (s, 2H); 8.49 (s, 1H); 10.17 (s, 2H)

4-アミノ-5-ニトロフルオレセイン (4-amino-5-nitro-3',6'-dihydroxy-Spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-(9H)xanthen]-3-one)

$C_{20}H_{12}N_2O_7$ , F.W. 392.316

$^1H$ -NMR (300MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  6.55 (dd, 2H, J = 8.6, 2.2); 6.65 (d, 2H, J = 2.2); 6.74 (d, 2H, J = 8.6); 7.59 (s, 1H); 7.73 (s, 2H); 7.74 (s, 1H); 10.12 (s, 2H)

【0036】4,5-ジアミノフルオレセイン (DAF-2: 5,6-diamino-3',6'-dihydroxy-Spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-(9H)xanthen]-3-one)

$C_{20}H_{14}N_2O_5$ , F.W. 362.322,

m.p. 240-250℃,

MS (EI) (m/z) M + 362

$^1H$ -NMR (300MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  5.00 (s, 2H); 5.58 (s, 2H); 6.07 (s, 1H); 6.52 (dd, 2H, J = 8.6, 2.2); 6.60

(10)

特開平10-226688

(d, 2H, J = 2.2); 6.60 (d, 2H, J = 8.6); 6.89 (s, 1H); 9.99 (s, 2H)

【0037】例5: DAF-4 及び DAF-6の製造

3-アセトアミド-4- ニトロ無水フタル酸と4-クロロベンゾルノールを用いて、例2と同様にしてDAF-4 及びDAF-6を製造した。

3-アミノ-4- ニトロジクロロフルオレセイン (3-amino-4-nitro-2',7'-dichloro-3',6'-dihydroxy-Spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-(9H)xanthen]-3-one)

$C_{20}H_{10}Cl_2N_2O_7$ , F.W. 461.200

$^1H$ -NMR (300MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  6.41 (d, 1H, J = 8.6); 6.87 (s, 2H); 7.03 (s, 2H); 7.83 (s, 2H); 8.36 (d, 1H, J = 8.6); 11.23 (s, 2H)

3,4-ジアミノジクロロフルオレセイン (DAF-4: 4,5-diamino-2',7'-dichloro-3',6'-dihydroxy-Spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-(9H)xanthen]-3-one)

$C_{20}H_{12}Cl_2N_2O_5$ , F.W. 431.216,

m.p. 240°Cで昇華し始め、300 °Cで融解せず

MS (EI) (m/z) M + 430

$^1H$ -NMR (300MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  5.14 (s, 2H); 5.97 (s, 2H); 6.12 (d, 1H, J = 7.7); 6.68 (s, 2H); 6.81 (d, 1H, J = 7.7); 6.85 (s, 2H); 10.97 (s, 2H)

【0038】6-アミノ-5- ニトロジクロロフルオレセイン (6-amino-5-nitro-2',7'-dichloro-3',6'-dihydroxy-Spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-(9H)xanthen]-3-one)

$C_{20}H_{10}Cl_2N_2O_7$ , F.W. 461.200

$^1H$ -NMR (300MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  6.60 (s, 2H); 6.93 (s, 2H); 6.93 (s, 2H); 7.22 (d, 1H, J = 8.6); 8.40 (d, 1H, J = 8.6); 11.17 (s, 2H)

5,6-ジアミノジクロロフルオレセイン (DAF-6: 6,7-diamino-2',7'-dichloro-3',6'-dihydroxy-Spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-(9H)xanthen]-3-one)

$C_{20}H_{12}Cl_2N_2O_5$ , F.W. 431.216,

m.p. 190-215°C,

MS (EI) (m/z) M + 430

$^1H$ -NMR (300MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  4.06 (s, 2H); 5.74 (s, 2H); 6.61 (s, 2H); 6.84 (d, 1H, J = 7.9); 6.89 (s, 2H); 7.10 (d, 1H, J = 7.9); 10.97 (s, 2H)

【0039】例6: DAF-5 の製造

4-アセトアミド-5- ニトロ無水フタル酸と4-クロロベンゾルシノールを用いて、例2と同様にしてDAF-5を製造した。

5-アミノ-4- ニトロジクロロフルオレセイン (5-amino-4-nitro-2',7'-dichloro-3',6'-dihydroxy-Spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-(9H)xanthen]-3-one)

$C_{20}H_{10}Cl_2N_2O_7$ , F.W. 461.200

$^1H$ -NMR (300MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  6.66 (s, 1H); 6.89 (s, 2H); 6.91 (s, 2H); 7.96 (s, 2H); 8.48 (s, 1H); 11.11 (s, 2H)

4-アミノ-5- ニトロジクロロフルオレセイン (4-amino-

5-nitro-2',7'-dichloro-3',6'-dihydroxy-Spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-(9H)xanthen]-3-one)

$C_{20}H_{10}Cl_2N_2O_7$ , F.W. 461.200

$^1H$ -NMR (300MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  6.9 (br, 2H); 6.91 (s, 2H); 7.63 (s, 1H); 7.77 (s, 2H); 7.86 (s, 1H); 11.07 (s, 2H)

【0040】4,5-ジアミノジクロロフルオレセイン (DAF-5: 5,6-diamino-2',7'-dichloro-3',6'-dihydroxy-Spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-(9H)xanthen]-3-one)

$C_{20}H_{12}Cl_2N_2O_5$ , F.W. 431.216,

m.p. 215-220°C,

MS (EI) (m/z) M + 430

$^1H$ -NMR (300MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  5.12 (s, 2H); 5.69 (s, 2H); 6.12 (s, 1H); 6.63 (s, 2H); 6.85 (s, 2H); 6.93 (s, 1H); 10.96 (s, 2H)

【0041】例7: DAF-2 DAの製造

例4で得たDAF-2 を炭酸セシウムを含むアセトニトリルに溶解し、1 当量の無水酢酸を加えて1 時間室温で撹拌した。溶媒を減圧留去した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製してDAF-2 DAを得た。

4,5-ジアミノフルオレセインジアセテート (DAF-2 DA: 5,6-diamino-3',6'-bis(acetyloxy)-Spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-(9H)xanthen]-3-one)

$C_{24}H_{18}N_2O_7$ , F.W. 446.404,

m.p. 110-120°C,

MS (EI) (m/z) M + 446

$^1H$ -NMR (300MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  2.27 (s, 6H); 4.68 (s, 2H); 5.16 (s, 2H); 6.19 (s, 1H); 6.92 (dd, 2H, J = 8.6, 2.2); 7.00 (d, 2H, J = 8.6); 7.12 (d, 2H, J = 2.2); 7.15 (s, 1H)

元素分析: C, 64.57; H, 4.06; N 6.28. Found: C, 64.27; H, 4.16; N 6.18.

【0042】例8: トリアゾール体の製造

上記の例2〜7で得たフルオレセイン化合物をメタノールに溶解し、一酸化窒素ガスを吹き込んだ後に溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して、対応するトリアゾール体を得た。

3,4-フルオレセイントリアゾール (DAF-1T: 3',6'-dihydroxy-Spiro[[4',5':4,5]triazoloisobenzofuran-1(3H),9'-(9H)xanthen]-3-one)

$C_{20}H_{11}N_3O_5$ , F.W. 373.318,

m.p. 300°C以上,

MS (EI) (m/z) M + 373

$^1H$ -NMR (300MHz, Acetone- $d_6$ )  $\delta$  6.60 (dd, 2H, J = 8.6, 2.4); 6.77 (d, 2H, J = 2.4); 6.77 (d, 2H, J = 8.6); 7.23 (d, 1H, J = 7.7); 8.43 (d, 1H, J = 7.7); 9.05 (s, 2H)

極大波長 Ex. 493 nm - Em. 521 nm

【0043】4,5-フルオレセイントリアゾール (DAF-2 T: 3',6'-dihydroxy-Spiro[[4',5':5,6]triazoloisobenzofuran-1(3H),9'-(9H)xanthen]-3-one)

(11)

特開平10-226688

enzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one)

 $C_{20}H_{11}N_3O_5$ , F.W. 373.318,

m.p. 300°C以上,

MS (EI) (m/z)  $M^+$  373 $^1H$ -NMR (300MHz, Acetone- $d_6$ )  $\delta$ 6.59 (dd, 2H, J = 8.8, 2.4); 6.72 (d, 2H, J = 8.8); 6.75 (d, 2H, J = 2.4); 7.68 (s, 1H); 8.56 (s, 1H)

極大波長 Ex. 491 nm - Em. 513 nm

【0044】5,6-フルオレセイントリアゾール (DAF-3 T: 3'',6''-dihydroxy-Spiro([4',5':6,7]triazoloisobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen)-3-one)

 $C_{20}H_{11}N_3O_5$ , F.W. 373.318,

m.p. 300°C以上,

MS (EI) (m/z)  $M^+$  373 $^1H$ -NMR (300MHz, Acetone- $d_6$ )  $\delta$ 6.54 (dd, 2H, J = 8.6, 2.4); 6.67 (d, 2H, J = 8.6); 6.79 (d, 2H, J = 2.4); 8.00 (d, 1H, J = 8.0); 8.24 (d, 1H, J = 8.0); 9.00 (s, 2H)

極大波長 Ex. 494 nm - Em. 521 nm

【0045】3,4-ジクロロフルオレセイントリアゾール (DAF-4T: 3'',6''-dihydroxy-2'',7''-dichloro-Spiro([4',5':4,5]triazoloisobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen)-3-one)

 $C_{20}H_9Cl_2N_3O_5$ , F.W. 442.202,

m.p. 300°C以上,

MS (EI) (m/z)  $M^+$  441 $^1H$ -NMR (300MHz, Acetone- $d_6$ )  $\delta$ 6.97 (s, 2H); 7.00 (s, 2H); 7.31 (d, 1H, J = 9.0); 8.46 (d, 1H, J = 9.0); 9.70 (s, 2H)

極大波長 Ex. 505 nm - Em. 530 nm

【0046】4,5-ジクロロフルオレセイントリアゾール (DAF-5T: 3'',6''-dihydroxy-2'',7''-dichloro-Spiro([4',5':5,6]triazoloisobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen)-3-one)

 $C_{20}H_9Cl_2N_3O_5$ , F.W. 442.202,

m.p. 300°C以上,

MS (EI) (m/z)  $M^+$  441 $^1H$ -NMR (300MHz, Acetone- $d_6$ )  $\delta$ 6.86 (s, 2H); 6.93 (s, 2H); 7.8 (br, 1H); 8.6 (br, 1H); 9.62 (s, 2H)

極大波長 Ex. 503 nm - Em. 523 nm

【0047】5,6-ジクロロフルオレセイントリアゾール (DAF-6T: 3'',6''-dihydroxy-2'',7''-dichloro-Spiro([4',5':6,7]triazoloisobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen)-3-one)

 $C_{20}H_9Cl_2N_3O_5$ , F.W. 442.202,

m.p. 300°C以上,

MS (EI) (m/z)  $M^+$  441 $^1H$ -NMR (300MHz, Acetone- $d_6$ )  $\delta$ 6.88 (s, 2H); 7.00 (s, 2H); 8.04 (d, 1H, J = 8.0); 8.23 (d, 1H, J = 8.0); 9.68 (s, 2H)

極大波長 Ex. 506 nm - Em. 529 nm

【0048】例9:一酸化窒素添加による式(I)の化合物の蛍光スペクトル変化

0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に 1  $\mu$ M の DAF-2 を溶解し、一酸化窒素ガスを溶液中に吹き込む前後での蛍光スペクトルの変化を測定した。結果を図1に示す。図中、(a) はガス導入前の蛍光スペクトルを示し、(b) はガス導入後のスペクトルを示す。極大蛍光波長の強度は、ガス導入前及び導入後でそれぞれ 12.24 (Ex. 495 nm - Em. 505 nm) 及び 232.9 (Ex. 495 nm - Em. 515 nm) であり、ガス導入後に反応系内で生成するトリアゾール化合物 (DAF-2T) により極大蛍光波長の強度が約19倍に増加していた。

【0049】例10:一酸化窒素生成量に依存した式(I)の化合物の蛍光強度変化

一酸化窒素の供給源として自発的 NO 発生剤である NOC 類 (Hrabie, J.A., J.Org. Chem., 58, pp.1472-1476, 1993) のうち NOC-12 (22°C, pH 7.4, 0.1 M リン酸緩衝液中での半減期 327分) 及び NOC-13 (同 13.7 分) を用い、反応液中に生成する一酸化窒素を DAF-2 と反応させた。反応溶媒として 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用い、各種濃度 (5  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 500  $\mu$ M) の NOC 類の存在下で 10  $\mu$ M の DAF-2 を 37°C で反応させて、蛍光強度の変化を測定した (測定波長: Ex. 495 nm - Em. 515 nm)。結果を図2に示す。図中、(a) 及び (b) はそれぞれ NOC12 及び NOC13 を用いた場合の結果を示しており、I, II, III 及び IV、並びに I', II', III' 及び IV' は、それぞれ 500  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 50  $\mu$ M 及び 5  $\mu$ M の NOC 類を存在させた場合の結果を示している。これらの結果から、DAF-2 から一酸化窒素生成量に依存してトリアゾール体が生成しており、一酸化窒素濃度を正確に反映した蛍光強度変化が観測できることが明らかである。

【0050】例11:式(I)の化合物の一酸化窒素測定感度

式(I)の化合物として DAF-2 を用い、一酸化窒素の測定感度を 2,3-ジアミノナフタレンと比較した。37°C の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) にそれぞれ 10  $\mu$ M の DAF-2 と 100  $\mu$ M の 2,3-ジアミノナフタレンを溶解し、一酸化窒素溶液を添加して一酸化窒素の濃度変化による蛍光の増加量を測定した。一酸化窒素溶液は 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) をアルゴンで置換した後、一酸化窒素を吹き込んで作成し、HRP 法 (Kikuchi, K. et al., Biol. Pharm. Bull., 19, pp.649-651, 1996) により濃度を求めた。蛍光の測定波長は、DAF-2 については Ex. 495 nm, Em. 515 nm; 2,3-ジアミノナフタレンについては Ex. 375 nm, Em. 425 nm とした。検量線による感度比較を行った結果を図3(a)に示す。図中、□は DAF-2、○は 2,3-ジアミノナフタレンの結果を示す。この結果から、DAF-2 は 2,3-ジアミノナフタレンに比べて約5倍の

(12)

特開平10-226688

感度を有していることが明らかである。

【0051】また、DAF-2 及び2,3-ジアミノナフタレンがそれぞれ一酸化窒素と反応して生成するトリアゾール体の合成標品を0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解して、濃度増加に応じた蛍光強度の増加を観測した。蛍光の測定波長は、DAF-2 由来のトリアゾール体 (DAF-2T) については Ex. 495 nm, Em. 515 nm; 2,3- ジアミノナフタレン由来のトリアゾール体 (ナフトトリアゾール) については Ex. 375 nm, Em. 425 nm とした。結果を図3(b) に示す。図中、□は DAF-2T、○はナフトトリアゾールの結果を示す。この結果から、DAF-2 に由来するトリアゾール化合物はナフトトリアゾールに比べて約24倍の蛍光強度を有していることが明らかである。

【0052】例12: pHの変動による感度変化

式(I) の化合物としてDAF-2 及び DAF-5を用い、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) にそれぞれ 100  $\mu$ M の濃度で溶解して、一酸化窒素を吹き込んだ。この溶液を、それぞれのpHのリン酸緩衝液に終濃度が約 1  $\mu$ M となるように加えて蛍光強度の測定を行った。蛍光の測定波長は、DAF-2 については Ex. 495 nm, Em. 515 nm; DAF-5については Ex. 505 nm, Em. 520 nm とした。結果を図4に示す。図中、□は DAF-2の結果を示し、◇は DAF-5の結果を示す。この結果から、DAF-2 は中性から弱塩基性領域において高い感度を維持していること、及び、DAF-5 は弱酸性から弱塩基性にわたる広いpH領域において高感度を維持できることが明らかである。

【0053】例13: 血管平滑筋細胞が産生する一酸化窒素のイメージング

底がガラス製のシャーレーにラット大動脈由来血管平滑筋細胞を培養し、LPS (12.5  $\mu$ g/ml), INF- $\gamma$  (150 U/ml), IL-1 $\beta$  (25U/ml), TNF- $\alpha$  (30 ng/ml)で刺激して一酸化窒素合成酵素の誘導を行った。約12時間培養を継続した後、培地をDAF-2 DA (例7, 10  $\mu$ M)を溶解した Krebs-Ringer-リン酸緩衝液 (KRP)に取り替え、細胞内に DAF-2 DA を取り込ませた。37°Cで1時間培養した後、細胞を洗浄し、培地をL-Arg 又は L-NMMA を溶解した Krebs-Ringer-リン酸緩衝液に交換した。細胞内の蛍光量の経時変化を蛍光顕微鏡下 (Ex. 490, Em. 515 nm 以上, 倍率 $\times$ 20) に観察した。

【0054】結果を図5に示す。図中、(a) は刺激後の細胞の培地を1 mM L-Argを含む培地で置換した後の変化を示し; (b) は工程(a) の培地を1 mM NMMA を含む培地で置換した後の変化を示し; (c) は工程(b) の培地を10 mM L-Arg を含む培地で置換した後の変化を示す。また、(d) は刺激後の細胞の培地を1 mM NMMA を含む培地で置換した後の変化を示し; (e) は無刺激の細胞の培地

を1 mM L-Argを含む培地で置換した後の変化を示す。細線は個々の細胞の蛍光強度を示し、太線はその平均値を示す。この結果から、DAF-2 DAが細胞内に取り込まれた後、細胞内の一酸化窒素と反応して蛍光を発していることが確認された。

【0055】

【発明の効果】本発明の化合物は一酸化窒素測定用の試薬として有用である。本発明の式(I)の化合物は、一酸化窒素と効率よく反応して蛍光性の式(II)の化合物を与える性質を有している。式(II)の化合物は、生体組織や細胞にダメージを与えない長波長の励起光の照射によって強い蛍光を発するので、個々の細胞内部の一酸化窒素濃度を正確に測定できるという特徴がある。

【図面の簡単な説明】

【図1】 一酸化窒素添加による式(I) の化合物の蛍光スペクトル変化を示した図である。(a) はガス導入前の式(I) の化合物の蛍光スペクトルを示し、(b) はガス導入後に反応系内で生成した式(II)の化合物の蛍光スペクトルを示す。

【図2】 一酸化窒素生成量に依存した式(I) の化合物の蛍光強度変化を示した図である。図中、(a) 及び(b) はそれぞれNOC12 及びNOC13 を用いた場合の結果を示し、I, II, III 及びIV、並びにI', II', III' 及びIV' は、それぞれ 500  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 50  $\mu$ M 及び 5  $\mu$ M のNOC 類を存在させた場合の結果を示す。

【図3】 式(I) の化合物と2,3-ジアミノナフタレンとの感度を比較した結果を示す図である。図中、(a) は検量線による感度比較を行った結果を示し、□は DAF-2、○は2,3-ジアミノナフタレンの結果を示す。(b) は一酸化窒素と反応して生成するトリアゾール体の蛍光強度を示し、□は DAF-2T、○はナフトトリアゾールの結果を示す。

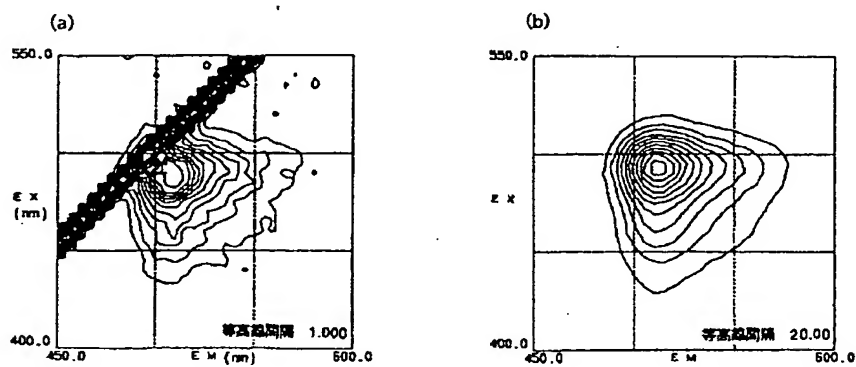
【図4】 式(I) の化合物のpH変動による感度変化の結果を示した図である。図中、□は DAF-2の結果を示し、◇は DAF-5の結果を示す。

【図5】 個々の細胞に存在する一酸化窒素を測定した結果を示した図である。図中、(a) は刺激後の細胞の培地を1 mM L-Argを含む培地で置換した後の変化を示し; (b) は工程(a) の培地を1 mM NMMA を含む培地で置換した後の変化を示し; (c) は工程(b) の培地を10 mM L-Arg を含む培地で置換した後の変化を示し; (d) は刺激後の細胞の培地を1 mM NMMA を含む培地で置換した後の変化を示し; 及び、(e) は無刺激の細胞の培地を1 mM L-Argを含む培地で置換した後の変化を示す。細線は個々の細胞の蛍光強度を示し、太線はその平均値を示す。

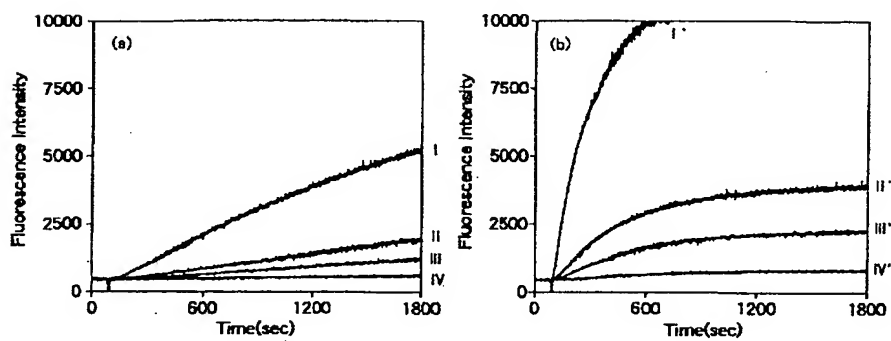
(13)

特開平10-226688

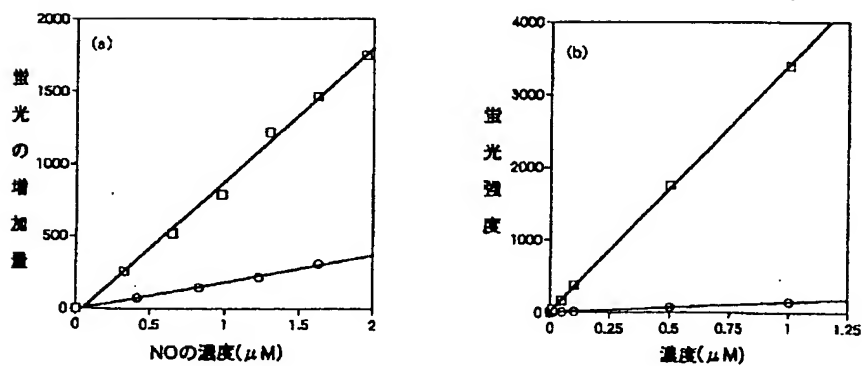
【図1】



【図2】



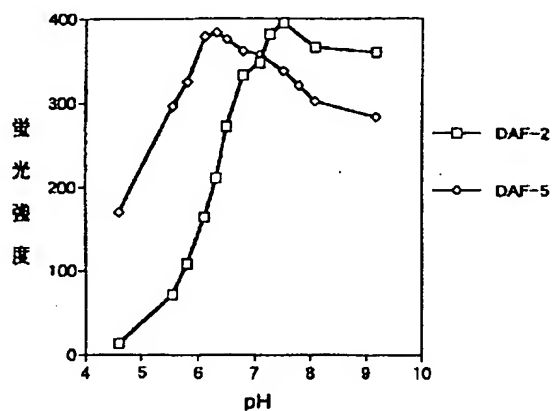
【図3】



(14)

特開平10-226688

【図4】



【図5】

